

BEST AVAILABLE COPY

MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO

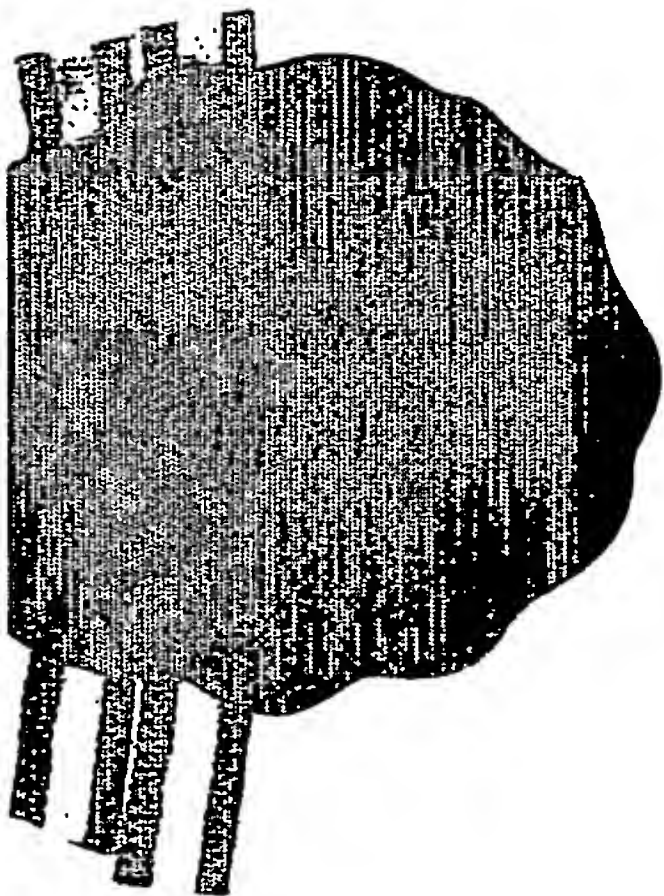
REC'D 06 SEP 2004

WIPO PCT

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200301054, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 8 de Mayo de 2003.

Madrid, 30 de Julio de 2004

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

MIGUEL HIDALGO LLAMAS

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200301054

03 MAY -8 12:53

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN: CÓDIGO

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA y en su nombre

y representación D. Gerardo Sanz Sáiz,

Director de O.T.R.I.

NOMBRE

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

CÓDIGO PAÍS

ES

DNI/CIF

Q5018001G

CNAE

803

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO C/ Baltasar Gracián 1, Entlo.

LOCALIDAD Zaragoza

PROVINCIA Zaragoza

PAÍS RESIDENCIA España

NACIONALIDAD Española

TELÉFONO 976 565003

FAX 976 350814

CORREO ELECTRÓNICO otri@unizar.es

CÓDIGO POSTAL 50005

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

(7) INVENTOR (ES):

Sarasa Barrio

NOMBRE

José Manuel

NACIONALIDAD

Española

CÓDIGO

PAÍS
ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

MÉTODO DE TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☐ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CODIGO

PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 20

☒ Nº DE REIVINDICACIONES: 15

☐ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS:

☒ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 2

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☐ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☐ OTROS:

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

200301054

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Anticuerpos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El uso de un anticuerpo, que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide, Ab40 y Ab42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

GRÁFICO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21	NÚMERO DE SOLICITUD
P200301054	
22	FECHA DE PRESENTACIÓN
62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA

31	NÚMERO	DATOS DE PRIORIDAD	32	FECHA	33	PAÍS
71	SOLICITANTE (S) UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA					
DOMICILIO BALTASAR GRACIÁN 1, ENTLO.			NACIONALIDAD ESPAÑOLA			
72	INVENTOR (ES) JOSE MANUEL SARASA BARRIO					
51	Int. Cl.			GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)		
54	TÍTULO DE LA INVENCION MÉTODO DE TRATAMIENTO DELA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER					
57	RESUMEN Anticuerpos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El uso de un anticuerpo, que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide, Ab40 y Ab42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.					

ANTICUERPOS EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La presente invención se relaciona con un método de
5 tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas
con la presencia de depósitos amiloides, entre las que
se encuentra la enfermedad de Alzheimer.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10

Se conocen ciertos hechos acerca de los fenómenos
bioquímicos y metabólicos asociados con la presencia de
la enfermedad de Alzheimer (AD). Dos cambios
morfológicos e histopatológicos observados en cerebros
15 con enfermedad de Alzheimer son las marañas
neurofibrilares (NFT) y los depósitos amiloides. Las
marañas neurofibrilares intraneuronales está presentes
también en otras enfermedades neurodegenerativas, pero
la presencia de los depósitos amiloides tanto en los
20 espacios intraneuronales (placas neuríticas) como en
las proximidades de la microvasculatura (placas
vasculares) parece ser característico de la enfermedad
de Alzheimer. De estas, las placas neuríticas parecen
ser las más frecuentes (Price, D.L., y col., Drug
25 Development Research (1985) 5:59-68).

El componente principal de estas placas amiloides es un
péptido de 40-42 aminoácidos denominado péptido
amiloide A β 4.

30

El péptido amiloide A β 4 es un polipéptido originado por
proteolisis a partir de unas glucoproteínas de membrana
denominadas proteínas precursoras del péptido amiloide
A β 4 (β APP). Estando estas proteínas, precursoras del
35 péptido amiloide, constituidas por 695 a 770

aminoácidos, siendo todas ellas producidas por el mismo gen.

Se han identificado dos variantes principales del péptido amiloide A β 4, el péptido A β 40 y el A β 42, de 40 y 42 aminoácidos respectivamente, que presentan una distribución tisular diferente en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Es la variante de 42 aminoácidos la forma predominante en las placas amiloides localizadas en cerebros de enfermos de Alzheimer.

Hasta la fecha se han propuesto diferentes posibles soluciones hacia una posible vacuna frente a la enfermedad de Alzheimer.

En EP526511 se propone la administración de dosis homeopáticas de A β a pacientes con AD preestablecida. Sin embargo, debido a que las dosis empleadas apenas varían los niveles de A β endógeno circulante en plasma, no se espera ningún beneficio terapéutico.

Schenk et al., (Nature, 1999 ; 400 : 173-177) describe la inmunización con A β 42, de ratones transgénicos PDAPP, los cuales sobreexpresan APP mutante humana, previniendo la formación de placas amiloides, distrofia neurítica y astrogliosis.

En WO9927944 (Schenk D.) se describe el tratamiento de AD por administración de A β 42 a un paciente.

Un ensayo clínico de fase II en 360 pacientes diagnosticados con media a moderada AD en 4 países Europeos y Estados Unidos en el que se empleaba péptido amiloide A β 42 como antígeno, fue discontinuado tras

reportarse encefalitis en algunos de los pacientes (Scrip Daily Online, 25 Feb 2002, S007455320, The Scientist 16[7]:22, Apr. 1, 2002).

- 5 El problema de emplear como vacuna una proteína endógena (o una proteína presente naturalmente en el animal que está siendo vacunado), como es en el caso de el péptido A β 42, el organismo responde fabricando anticuerpos frente a A β 42 y frente a fracciones más
- 10 cortas que pueden tener también funciones fisiológicas todavía desconocidas, entre algunos de los posibles problemas podemos citar el posible desarrollo de enfermedades autoinmunes debido a la generación de anticuerpos frente a la proteína endógena, dificultad
- 15 en la generación de una respuesta inmune debido al fallo del sistema inmune para reconocer antígenos endógenos, posible desarrollo de una respuesta inflamatoria aguda.
- 20 La presente invención está dirigida al tratamiento de Alzheimer y otras enfermedades amiloideas por administración de un péptido, de la parte C-terminal de A β , conjugado con una proteína, que en una realización preferida de la presente invención dicha proteína es la
- 25 hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

- 30 La presente invención se relaciona con una vacuna para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades amiloideas relacionadas.
- 35 Según una realización preferida de la presente

invención, se proporciona una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras enfermedades relacionadas, que supera las desventajas asociadas a usar péptidos, proteínas o
 5 inmunógenos endógenos.

Ejemplos de otras enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides son Síndrome Hereditario Islándico, mieloma múltiple, encefalopatías espongiforme,
 10 incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

La inducción de una respuesta inmune puede ser activa como cuando un inmunógeno es administrado para inducir anticuerpos que reaccionan con A β en un paciente, o
 15 pasiva, como cuando es administrado un anticuerpo que reacciona por sí mismo con A β en un paciente.

Para los propósitos de la presente invención, los siguientes términos son definidos a continuación:

20

El término "enfermedades amiloideas relacionadas" incluye enfermedades asociadas con la acumulación de amiloide el cual puede estar restringido a un organo, amiloidosis localizada, o difundido en varios organos,
 25 amiloidosis sistémica. Amiloidosis secundaria puede ser asociada con infecciones crónicas (como p.e. tuberculosis) o inflamación crónica (p.e. artritis reumatoide), Fiebre Mediterránea Familiar (FMF) y otro tipo de amiloidosis sistémica encontrada en pacientes
 30 en tratamiento de hemodiálisis de largo plazo. Formas localizadas de amiloidosis incluye, sin limitarse a estas, diabetes tipo II y cualquier otra enfermedad relacionada con esta, enfermedades neurodegenerativas con SCRAPIE, encefalitis espongiforme bovina,

enfermedad de Cretzfeldt-Jakob, enfermedad de Alzheimer, angiopatía amiloide cerebral.

5 El término "inmunización pasiva" es utilizado para referirse a la administración de anticuerpos o fragmentos de ellos a un individuo con la intención de conferirle inmunidad.

10 En un primer aspecto, la invención proporciona el uso bien de un péptido que actúa como inmunógeno o bien de un anticuerpo, en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos
15 amiloides. Dichos métodos consisten en la inducción de una respuesta inmune contra un componente peptídico de los depósitos amiloides en el paciente. Dicha inducción puede ser activa por administración de un inmunógeno o pasiva por administración de un anticuerpo o un
20 fragmento activo o derivado de un anticuerpo.

En una realización preferida de la presente invención, la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

25 El medicamento obtenido puede ser empleado tanto en pacientes asintomáticos como en aquellos que ya muestran síntomas de la enfermedad.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones capaces de provocar una respuesta inmune dirigida
30 contra ciertos componentes de las placas amiloideas son efectivas para el tratamiento o prevención de enfermedades relacionadas con depósitos amiloides. En particular, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, es posible prevenir el progreso, disminuir
35 los síntomas y/o reducir el proceso de deposición

amiloide en un individuo, cuando una dosis inmunoestimuladora de un péptido o de un anticuerpo obtenido a partir de éste, es administrado a el paciente.

5

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los anticuerpos son obtenidos por inmunización de mamíferos o aves, mediante el empleo de un péptido conjugado a una proteína como inmunógeno.

10

Según una forma de realización preferida de la presente invención, los mamíferos empleados para su inmunización pueden ser rumiantes, équidos, lagomorfos, carnívoros, primates o cualquier otro animal que permita obtener cantidades de suero adecuadas como para extraer de éste suficiente cantidad de anticuerpo. De entre las aves empleadas para su inmunización podemos citar, no considerándose de forma limitativa, las galliformes, anseriformes y columbiformes, entre otras.

15

20

Según una forma de realización preferida de la presente invención, ésta proporciona el uso de un péptido conjugado a una proteína que actúa como inmunógeno para la producción de anticuerpos capaces de reconocer de

25

forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro de un

30

Según una forma de realización más preferida de la presente invención, la proteína utilizada para su conjugación con el péptido es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

35

De acuerdo con una realización aún más preferida de la presente invención, el péptido es seleccionado entre un grupo que consiste en el péptido de SEQ ID NO 1, el
5 péptido de SEQ ID NO 2, el péptido de SEQ ID NO 3, el péptido de SEQ ID NO 4, los péptidos resultantes de acortar por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4 y los
10 péptidos resultantes de alargar por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína a cualquiera de los péptidos de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4.

15 De acuerdo con otra realización preferida, el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 1, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1 y los péptidos
20 resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra realización preferida de la presente invención,
25 el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 2, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las
30 secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra realización preferida, el péptido es
seleccionado entre el grupo constituido por el péptido
35 de SEQ ID NO 3, los péptidos con una secuencia

resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra realización preferida, el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 4, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

De acuerdo con otra forma de realización de la presente invención, ésta proporciona el uso de un anticuerpo o un fragmento activo o derivado de un anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide, A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro de un paciente.

Según una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo o un fragmento activo o derivado del anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido A β , es obtenido a partir de un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los

restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína.

En otra forma de realización más preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 1, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 2, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 3, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En otra forma de realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o
5 aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por el péptido de SEQ ID NO 4, los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4 y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las
10 secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

En esta solicitud los aminoácidos se abrevian utilizando los códigos de una letra aceptados en
15 el campo, en la forma que se muestra a continuación:

A= Ala= alanina,
C= Cys= cisteína,
D= Asp= ácido aspártico,
20 E= Glu= ácido glutámico,
F= Phe= fenilalanina,
G= Gly= glicina,
H= His= histidina,
I= Ile= isoleucina,
25 K= Lys= lisina,
L= Leu= leucina,
M= Met= metionina,
N= Asn= asparagina,
P= Pro= prolina
30 Q= Gln= glutamina,
R= Arg= arginina,
S= Ser= serina,
T= Thr= treonina,
V= Val= valina,
35 W= Trp= triptofano,

Y= Tyr= tirosina,

Las secuencias descritas anteriormente en la presente
 invención, e identificadas como SEQ ID NO 1, SEQ ID NO
 5 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4 se corresponden con las
 siguientes secuencias de aminoácidos:

	SEQ ID NO 1	LVFFAEDV
	SEQ ID NO 2	GLMVGGVV
10	SEQ ID NO 3	GLMVGGVVIA
	SEQ ID NO 4	RHDSGYEVHHQK

Los anticuerpos obtenidos a partir de los péptidos
 anteriores reciben en la presente solicitud los códigos
 15 de SAR-1, SAR-2, SAR-3 y SAR-4 correspondiéndose con
 éstos como se indica a continuación:

	SEQ ID NO 1	SAR-2
	SEQ ID NO 2	SAR-3
20	SEQ ID NO 3	SAR-4
	SEQ ID NO 4	SAR-1

La información relativa a la identificación de las
 secuencias peptídicas, descritas en la presente
 25 invención, que se acompaña a la presente memoria en
 formato legible por ordenador, es idéntica al listado
 de secuencias que se presenta acompañando a la memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30

Figura 1.- Placas amiloides en cerebros con Alzheimer
 detectadas con los anticuerpos SAR-1, SAR-2, SAR-3 y
 SAR-4.

Figura 2.- Western Blot en el que se demuestra la especificidad de los anticuerpos. SAR-3 detecta específicamente la proteína amiloide de 40 aminoácidos (A β 40), SAR-4 la de 42 aminoácidos (A β 42) y SAR-1 las dos isoformas, pero teniendo más afinidad por la supuestamente más neurotóxica A β 42. En cada calle se ha cargado el péptido indicado (A β 40 ó A β 42) en la cantidad de nanogramos especificada (10, 100, 200 ó 500). En los westerns se aprecia también que los anticuerpos SAR-3 y SAR-4 detectan tanto los monómeros (mucho más abundantes) como los dímeros del péptido correspondiente.

EJEMPLOS

15

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

20

Ejemplo 1. Generación de los anticuerpos policlonales.

Los cuatro anticuerpos policlonales fueron generados por inmunización de conejos New Zealand White contra los cuatro péptidos acoplados a KLH que se utilizaron como inmunógeno.

25

Cada inmunógeno se inyectó en dos conejos, realizándose cinco inyecciones: la primera inyección intradérmica del conjugado péptido-KLH en PBS y emulsionados en adyuvante completo de Freund y cuatro más

30

intramusculares, a modo de dosis de recuerdo en los días 14, 28, 49 y 80, del mismo conjugado péptido-KLH en PBS pero esta vez emulsionados en adyuvante incompleto de Freund, realizándose la sangría de control a los 90 días para detectar la presencia de los anticuerpos.

35

Tras la recogida de sangre, se separó el suero y se
 prepurificó mediante desalado y posteriormente se
 purificaron los anticuerpos por afinidad en una matriz
 5 compuesta por 1,5 ml de material EMD-Epoxy activated
 (Merck) a la que se añadió 5mg del correspondiente
 péptido. Las fracciones purificadas se estabilizaron en
 0.1% de BSA (Sigma) y se conservaron a 4 °C, pudiéndose
 añadir glicerol 20-50% como crioprotector.

10

Ejemplo 2. WESTERN-BLOT para A β

1. ELECTROFORESIS

15 Se utilizó el método de Laemmli, descrito en Current
 Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons,
 New York, 1998, modificado para mejorar la separación
 de péptidos pequeños.

20 El aparato empleado fué un Miniprotean 3 de Bio-Rad.

Se utilizó un gel del 15% de acrilamida, mezclando los
 siguientes componentes:

25

SOLUCIONES STOCK	SEPARATING GEL (15 %)	STACKING GEL
40 % Acrilamida	3,75 ml	500 μ l
Tris 3 M pH=8,45	3,3 ml	250 μ l
Glicerol	1,05 ml	-
Agua	1,9 ml	4,2 ml
30 SDS 20 %	50 μ l	18,6 μ l
APS 10%	50 μ l	25 μ l
TEMED	10 μ l	5 μ l

Se partió de disoluciones stock de péptido A β 40 y 42 de
 35 1 mg/ml. (disueltos en PBS). Se tomó el volumen

necesario de estas soluciones para cada una de las muestras y lo llevamos hasta 20 μ l con SBLT (SBL + Tris base 2 M). A continuación se hirvieron las muestras durante 5 minutos para desnaturalizar los péptidos y eliminar posibles proteasas.

Se llenó el centro de la cubeta con tampón catódico y el exterior con tampón anódico, siendo la composición de estos tampones las siguientes:

10

Tampón Anódico

24.2 g Tris base (0.2 M final)

Diluir a 1 litro con H₂O

Ajustar a pH 8.9 con HCl concentrado

15 Almacenar a 4°C hasta 1 mes

Tampón Catódico

12.11 g Tris base (0.1 M final)

17.92 g tricine (0.1 M final)

20 1 g SDS (0.1% final)

Diluir a 1 litro con H₂O

No ajustar el pH.

Almacenar a 4°C hasta 1 mes

25 Finalmente se cargaron las muestras en los pocillos: 20 μ l/pocillo. Utilizando como marcador el Polypeptide Standard Kaleidoscope de Bio-Rad, se comenzó la migración a bajo voltaje (30 V), y posteriormente se subió hasta los 100 V, transcurrida aprox. 1 hora de electroforesis

30

2.- TRANSFERENCIA A MEMBRANA

Se transfirieron las proteínas separadas en el gel a una membrana de PVDF, mediante el electroblotting. En los "librillos" de transferencia se colocaron:

- 5 Lado negro---esponja---3 papeles Whatmann (o de filtro)--- gel--- membrana--- 3 papeles Whatmann--- esponja--- lado transparente

10 A continuación se llenó la cubeta con "electroblotting buffer":

Glicina 38 mM
Tris base 50 mM
Metanol 40%

15

Se realizó la transferencia durante 2 horas a 200 mA. Durante la transferencia se mantuvo la agitación del buffer con agitador magnético.

20 3.- INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS

Los anticuerpos y la leche en polvo se disolvieron en PBS-T (PBS + 0,5 % Tween 20), realizándose los lavados también con PBS-T.

- 25 Tras la transferencia se bloqueó la superficie de la membrana con solución 5 % de leche en polvo, durante 1 hora con agitación y a temperatura ambiente (RT)

Tras lo cual se lavó la membrana 2 x 5 min. a RT.

30

A continuación se incubó con anticuerpo primario (SAR-1, SAR-2, SAR-3 o SAR-4) 1 hora a RT como mínimo diluido 1:500 en PBS-T.

- 35 Se realizó el lavado de la membrana: 3 x 10 min. a RT

Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario:
anti-conejo de cabra conjugado a peroxidasa de rábano
(goat anti-rabbit-HRP) durante 1 hora a RT (1:10.000 en
5 todos los casos).

Se realizó de nuevo el lavado de la membrana: 3 x 10
min. a RT

10 4.- REVELADO

Tras el último lavado se incubó la membrana con la
solución del kit de quimioluminiscencia. Utilizándose
el kit ECL+Plus de Pharmacia.

15

Se envolvió la membrana en papel celofán y la expusimos
a film (Hyperfilm MP de Amersham) de doble emulsión,
durante distintos tiempos, entre 30 seg. y 2 minutos.

20 Ejemplo 3. Inmunohistoquímica con anticuerpos SAR-1, SAR-2, SAR-3 y SAR-4 en tejido de cerebro humano.

Las secciones de tejido se fijaron en parafina
siguiendo los siguientes pasos:

- 25 a) fijación en formol neutro al 10%
- b) deshidratación por pases sucesivos en
concentraciones crecientes de alcohol
- c) pases por xilol y parafina, esta última en estufa
de 60-62 °C
- 30 d) realización de los bloques de parafina, los
cuales se cortan a 4 micras y se montan en
portaobjetos

A continuación, dichas secciones fueron desparafinadas
35 mediante pases por las siguientes soluciones:

- | | | | |
|---|--------|------|---------------------|
| | Xilol | 100% | 10 minutos |
| | Xilol | 100% | 10 minutos |
| | Etanol | 100% | 5 minutos |
| 5 | Etanol | 100% | 5 minutos |
| | Etanol | 96% | 5 minutos |
| | Etanol | 90% | 5 minutos |
| | Etanol | 70% | 5 minutos |
| | PBS | | 5 minutos X 3 veces |
- 10
- Posteriormente se trataron de la siguiente forma:
- a) Ácido fórmico al 96% durante 3 minutos en campana de gases y en agitación.
- b) Lavado rápido de agua
- 15 c) Lavados en PBS 2 X 5 minutos
- d) Bloqueo de las peroxidasas endógenas durante 15 minutos en una solución formada por 70ml de PBS, 30ml de metanol y 1ml de H₂O₂
- e) Lavados en PBS 3 X 5 minutos
- 20 f) Lavados en PBS/T (Triton o Tween-20 al 0,5% en PBS) 3 X 5 minutos
- g) Bloqueo de las uniones inespecíficas con suero de cabra (Normal Goat Serum) diluído 10:100 en PBS/T durante dos horas
- 25 h) Incubación de los anticuerpos primarios toda la noche a 4° C en cámara húmeda:
- SAR-1...Dilución 1:150 en PBS
- SAR-2...Dilución 1:1500 en PBS
- SAR-3...Dilución 1:1500 en PBS
- 30 SAR-4...Dilución 1:2000 en PBS
- i) Lavados de PBS/T 3 X 5 minutos
- j) Incubación en anticuerpo secundario (anti-conejo de cabra) diluído 1:200 en PBS durante 45 minutos
- k) Lavados de PBS 4 X 5 minutos

1) Incubación del ABC (complejo avidina-biotina) de Vector Labs a una dilución de 1:100 en PBS/T durante 45 minutos en oscuridad, manteniéndose esta condición hasta finalizar el revelado

5 m) Lavados de PBS 3 X 5 minutos

n) Revelado en diaminobencidina (DAB).

Se controló el tiempo empíricamente bajo microscopio estereoscópico. Para ello, primero se hizo un lavado en
 10 una solución de Tris-HCl 0.5 M durante 10 minutos en agitación, para proseguir con la incubación con un sustrato diaminobencidina (DAB) diluida en Tris-HCl 0.05M y a la que se añade 0.5 μ l/ml de H₂O₂ a 4°C. Una vez finalizada la reacción se realizaron tres lavados
 15 en PBS a 4°C de 5 minutos cada uno y se procedió a la deshidratación en etanol al 70%, 90% y 100% durante 2 minutos cada uno, pase por xilol de 4 minutos y otro pase de xilol de 2 minutos, hasta que se montaron con Eukitt para su observación al microscopio.

20

Listado de Secuencias.

NUMERO DE SECUENCIAS: 4

25

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 1:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

30 TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val

35

1

5

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 2:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 8

5 TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 2

10 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

1

5

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 3:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

15 LONGITUD: 10

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

20 SEQ ID NO 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

1

5

10

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 4:

25 CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 12

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

30 DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1

5

10

35

REIVINDICACIONES

1. El uso de un péptido conjugado a una proteína que actúa como inmunógeno para la producción de anticuerpos capaces de reconocer de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro de un paciente.
2. El uso según la reivindicación anterior caracterizado porque la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.
3. El uso según la reivindicación anterior 1, caracterizado porque la proteína es la hemocianina de lapa (KLH).
4. El uso según cualquiera de la reivindicaciones anteriores 1 a 3, caracterizado porque el péptido es seleccionado a partir de un grupo que consiste en:
 - el péptido de SEQ ID NO 1, el péptido de SEQ ID NO 2, el péptido de SEQ ID NO 3, el péptido de SEQ ID NO 4;
 - los péptidos resultantes de acortar por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4;
 - y los péptidos resultantes de alargar por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína a cualquiera de los péptidos de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4.

5. El uso según la reivindicación anterior 4,
caracterizado porque el péptido es seleccionado
entre el grupo constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 1;
 - 5 - los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 1;
 - y los péptidos resultantes de añadir a
cualquiera de las secuencias precedentes,
10 los restos de aminoácido necesarios para la
conjugación de la proteína.
6. El uso según la reivindicación anterior 4,
caracterizado porque el péptido es seleccionado
entre el grupo constituido por:
- 15 - el péptido de SEQ ID NO 2;
 - los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 2;
 - y los péptidos resultantes de añadir a
20 cualquiera de las secuencias precedentes,
los restos de aminoácido necesarios para la
conjugación de la proteína.
7. El uso según la reivindicación anterior 4,
caracterizado porque el péptido es seleccionado
entre el grupo constituido por:
- 25 - el péptido de SEQ ID NO 3;
 - los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 3;
 - 30 - y los péptidos resultantes de añadir a
cualquiera de las secuencias precedentes,
los restos de aminoácido necesarios para la
conjugación de la proteína.

8. El uso según la reivindicación anterior 4, caracterizado porque el péptido es seleccionado entre el grupo constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 4;
 - 5 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4;
 - 10 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
9. El uso de un anticuerpo o un fragmento activo o derivado de un anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido beta amiloide, A β 40 y A β 42 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad caracterizada por la acumulación de depósitos amiloides en el cerebro de un paciente.
- 15 10. El uso según la reivindicación anterior 9, caracterizado porque la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.
- 20 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 9 a 10, caracterizado porque el anticuerpo o un fragmento activo o derivado del anticuerpo que reconoce de forma específica cualquiera de las variantes predominantes del péptido A β , es obtenido a partir de un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en
- 25 SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los restos de aminoácido apropiados para
- 30 conjuguar la proteína.
- 35

12. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 1;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1;
 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
13. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 2;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 2;
 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
14. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 3;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3;

- y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
- 5 15. El uso según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento activo o derivado del anticuerpo, es obtenido por inmunización de mamíferos o aves con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:
- 10
- el péptido de SEQ ID NO 4;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 4;
 - y los péptidos resultantes de añadir a
- 15
- cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.

Organization Applicant

Street : C/ Baltasar Gracián 1, Entlo

City : Zaragoza

State :

Country : Spain

PostalCode : 50005

PhoneNumber :

FaxNumber :

EmailAddress :

<110> OrganizationName : Universidad de Zaragoza

Application Project

<120> Title : Anticuerpos en la preparación de un medicamento para el

tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

<130> AppFileReference :

<140> CurrentAppNumber :

<141> CurrentFilingDate : ____-____-____

Sequence

<213> OrganismName : Síntesis Química

<400> PreSequenceString :

LVFFAEDV

8

<212> Type : PRT

<211> Length : 8

SequenceName : SEQ ID NO 1

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Síntesis Química

<400> PreSequenceString :

GLMVGGVV

8

<212> Type : PRT

<211> Length : 8

SequenceName : SEQ ID NO 2

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Síntesis Química

<400> PreSequenceString :

GLMVGGVVIA

10

<212> Type : PRT

<211> Length : 10

SequenceName : SEQ ID NO 3

SequenceDescription :

Sequence

<213> OrganismName : Síntesis Química

<400> PreSequenceString :

RHDSGYEVHH QK

12

<212> Type : PRT

<211> Length : 12

SequenceName : SEQ ID NO 4

SequenceDescription :

21042003.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Universidad de Zaragoza

<120> Anticuerpos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Síntesis Química

<400> 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Síntesis Química

<400> 2

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Síntesis Química

<400> 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Síntesis Química

21042003.ST25

<400> 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.